

**DER EINFLUSS VON LANGZEITINFUSIONEN
MIT GLUKAGON AUF DIE
LEBERZELLREGENERATION
NACH TEILHEPATEKTOMIE BEI RATTEN**

Wolfgang Strecker

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0012

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie,
Abteilung für Experimentelle Medizin,
Martinsried bei München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

DER EINFLUSS VON LANGZEITINFUSIONEN MIT GLUKAGON AUF DIE
LEBERZELLREGENERATION NACH TEILHEPATEKTOMIE BEI RATTEN.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Strecker

aus
München

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gerhard Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gustav Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 11. 1980



1.	Einleitung	1
1.1.	Die Leberzellregeneration nach Teilhepatektomie	1
1.2.	Die mögliche Bedeutung von Insulin und Glukagon für die Regelung der Leberzellproliferation	2
1.3.	Fragestellung	3
2.	Materialien und Methoden	5
2.1.	Verwendete Geräte	5
2.2.	Verwendete Materialien	6
2.3.	Lösungen	7
2.4.	Tiere	7
2.5.	Operationen	8
2.5.1.	Teilhepatektomie	8
2.5.2.	Venenpunktion (Venae sectio)	8
2.6.	Infusionen	9
2.6.1.	Infusionstechnik	9
2.6.2.	Applikation der Infusionslösungen	10
2.7.	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	10
2.7.1.	Grundprinzip	10
2.7.2.	Behandlung der Tiere	11
2.7.3.	Gewinnung der Leberzellkerne	11
2.7.4.	DNA-Extraktion	12
2.7.5.	Bestimmung des DNA-Gehaltes	13
2.7.6.	Messung der Radioaktivität	13
2.7.7.	Berechnung und statistische Auswertung	14
3.	Ergebnisse	15
3.1.	Spezifische Radioaktivität nach 22-stündiger Infusion mit Glukagon ohne Teilhepatektomie	15

3.2.	Spezifische Radioaktivität nach 22-stündiger Infusion mit Glukagon und Teilhepatektomie	15
3.3.	Spezifische Radioaktivität zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie und Infusionsbeginn	16
3.4.	Spezifische Radioaktivität nach 22-stündiger Infusion mit Des-Histidin-Glukagon und Teilhepatektomie	17
4.	Besprechung	19
5.	Zusammenfassung	23
6.	Abkürzungen	24
7.	Literaturverzeichnis	25

1. EINLEITUNG

1.1. Die Leberzellregeneration nach Teilhepatektomie

Im Gleichgewichtszustand halten sich der Abbau und die Teilung von Zellen in den Organen des menschlichen und tierischen Körpers die Waage. In der Leber ist der Zellumsatz unter physiologischen Bedingungen verhältnismäßig gering: unter etwa 10 000 Leberparenchymzellen befindet sich nur eine einzige im Teilungsstadium. Wird jedoch ein größerer Teil der Leber auf einmal funktionell ausgeschaltet, beispielsweise durch Zellgifte, Sauerstoff- oder Blutmangel oder durch eine operative Entfernung eines Teils der Leber (=Teilhepatektomie), so steigt die Zellteilungsrate auf ein Vielfaches des Ruhewertes an. Werden bei etwa 200 g schweren Ratten $\frac{2}{3}$ der Leber operativ entfernt, so zeigt sich 20 bis 24 Stunden postoperativ eine Steigerung der DNA-Syntheserate auf das 30-50 fache des Ausgangswertes, der wenige Stunden später eine Welle von Zellteilungen folgt. Diese erhöhten Mitoseraten der Leberzellen vermindern sich im Laufe der nächsten Tage, bis nach etwa zwei Wochen die ursprüngliche Lebermasse fast wieder erreicht ist (Übersichten: 4, 10, 22).

Die Frage, auf welche Weise die Regelung der Leberzellproliferation vor sich geht, ist trotz einer Reihe von wichtigen Fortschritten der letzten Zeit (6, 9, 17, 21, 25) in vielen Einzelheiten noch ungeklärt. Insbesondere ist noch nicht endgültig geklärt, ob mehrere unspezifische Faktoren zusammenspielen, um eine Steigerung der Leberzellproliferation im Bedarfsfall her-

beizuführen, oder aber, ob es ein leberspezifisches Proliferationshormon gibt, das zur Entfaltung seiner Wirkung jedoch unspezifische Zusatzfaktoren benötigt; diese würden die Wirkung des spezifischen Hormons modifizierend beeinflussen. Die neueren oben zitierten Arbeiten sprechen aber für die zweite Alternative.

1.2. Die mögliche Bedeutung von Insulin und Glukagon für die Regelung der Leberzellproliferation

Zu den Faktoren, denen eine Mitwirkung an der Proliferationssteigerung der Leberzellen zugesprochen wird, gehören die beiden Pankreashormone Insulin und Glukagon. Beim Insulin finden die meisten Autoren sowohl in vivo als auch in vitro eine gewisse Proliferationssteigerung (1, 8, 15), während beim Glukagon die Ergebnisse kontrovers sind (1, 3, 5, 8, 11, 14, 23). Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in den Versuchsan-sätzen zurückzuführen. Eine genaue Analyse der Konzentrationen dieser beiden Hormone im Blutplasma über einen längeren Zeitraum nach Teilhepatektomie (TH) ergab 12 Stunden postoperativ einen Anstieg der Konzentration von immunoreaktivem Glukagon (IRG) auf das 5-6 fache, während das immunoreaktive Insulin (IRI) auf 13 % des Ausgangswertes abfiel (26). Der starke Konzentrationsanstieg des immunoreaktiven Glukagon, der in vermindertem Ausmaß in der ersten postoperativen Woche anhielt, läßt sich möglicherweise durch eine Reihe von metabolischen Veränderungen im Blut teilhepatektomierter Ratten erklären: Einige Stunden nach Teilhepatektomie fällt die Serumkonzen-

tration von Glukose und einigen Fettsäuren ab, während die Serumkonzentration der freien Aminosäuren ansteigt (27). Die Konzentrationsänderungen von Glukagon und Insulin lösen vermutlich den Konzentrationsanstieg von zyklischem Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP) in der Leberzellmembran aus (26). Es ist nicht ausgeschlossen, daß cAMP ein Bindeglied zwischen extrahepatischen leberzellproliferativen Faktoren und intrahepatozytären Vorgängen der Zellteilung darstellt. Diese Ansicht wird gestützt durch Versuche von MacManus und Whitfield (18), in denen bei Ratten durch Infusion einer Lösung mit Trijodthyronin, Aminosäuren, Glukagon und Heparin sowohl eine Steigerung der cAMP-Konzentration in der Leberzellmembran, als auch eine nachfolgende Zunahme der Leberzellteilungen ausgelöst wurde. Durch zusätzliche Applikation von einem α -Rezeptorenblocker wurde nicht nur der Anstieg der cAMP-Konzentration verhindert, sondern auch die Steigerung der Mitoserate. Es ist denkbar, daß der intrahepatozytäre Weg der Stimulation der Leberzellproliferation über eine - durch cAMP angeregte - Phosphorylierung von Histonen führt, mit der Folge einer Deblockade und Reduplikation nukleärer DNA.

1.3. Fragestellung

Dieses angedeutete Modell der Stimulation der Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie bei Ratten verlangt nach einer experimentellen Nachprüfung der einzelnen Schritte. So war völlig ungewiß, ob die nach Teilhepatektomie auftretenden metabolischen Veränderungen im Serum und die dadurch anscheinend

ausgelösten hormonellen Veränderungen spezifischer oder unspezifischer Natur sein würden. Insbesondere interessierte die mögliche Bedeutung von Glukagon für die Regelung der Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie.

Zur Klärung dieser Frage wurden unterschiedliche Mengen an Glukagon in Infusionen von unterschiedlicher Dauer unbehandelten und teilhepatektomierten Ratten zugeführt. Nach Beendigung der Infusionen wurde die DNA-Synthese in den Lebern bzw. Restlebern durch Messung der spezifischen DNA-Radioaktivität bestimmt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Verwendete Geräte

Elvehjem-Potter, Typ 853 202	Braun (Melsungen)
Flüssigkeitsszintillationszähler SL 30	Intertechnique (Paris)
Mikroliter-Spritzen	C. Hamilton Manufacturing (Bonaduz, Schweiz)
Minifuge 2	Heraeus-Christ (Osterode / Harz)
Osmometer	Knauer (Berlin)
Perfusor IV, Typ 871 102 mit Spezialrekordspritze, 10 ml und Infusionsleitung, 100 cm	Braun (Melsungen)
pH-Meter PHM 26	Radiometer (Kopenhagen)
Schüttelinkubator	Köttermann (München)
Spektralphotometer DB	Beckman Instruments (München)
Ultrazentrifuge IEC / B 60 mit Rotor SB 405	Biotronik (München)
Waagen	Mettler (Zürich)
Whirlmixer	Cenco-Instrumenten (Berde / Niederlande)

2.2 Verwendete Materialien

Aether pro narcosi, DAB 7	Hoechst AG (Frankfurt / Main)
Altromin-Standardfutter, Nr. 1324	Altrogge (Lage / Lippe)
Braunöle, Größe 0	Braun (Melsungen)
Catgut	Ethicon (Norderstedt bei Hamburg)
DNA (Kalbsthymus)	Serva (Heidelberg)
Glucagon Novo	Novo Industrie GmbH (Mainz)
Heparin (Vetren [®])	Promonta (Hamburg)
Histoacryl [®] blau	Braun (Melsungen)
Merfen [®] orange	Zyma (München)
Mersilene	Ethicon (Norderstedt bei Hamburg)
Nobecutan-Spray	Astra-Chemicals (Wedel / Holstein)
Nylon-Filter	Breitsamer (München)
Rinderserumalbumin	Behringwerke (Marburg)
(6- ³ H)-Thymidin (21,5 Ci/mmol)	Amersham-Buchler (Braunschweig)

Das synthetisierte Des-Histidin-Glukagon war ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. E. Wunsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München. Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen und waren von pro analysi Qualität.

2.3. Lösungen

Infusionslösungen: Die Zusammensetzung für jeweils 8 h Infusionsdauer: Gewünschte Menge an Glukagon (s. 2.6.2.) in jeweils 500 µl 10 mM NaOH lösen, 500 µl Heparin ($\pm$ 500 I.E.), 7 ml physiologische NaCl-Lösung mit 0,35 mg Rinderserumalbumin. Bei den Vergleichsinfusionen wird lediglich das Glukagon weggelassen.

Diphenylamin-Acetaldehyd-Lösung zur DNA-Bestimmung:

Diphenylamin-Lösung: 1,5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig
1,5 ml konz. H_2SO_4
In dunkler Flasche bei Raumtemperatur aufbewahren.

Acetaldehyd-Lösung: 2,0 ml Acetaldehyd
Aq. bid. ad 100 ml
Bei 4 °C aufbewahren.

Kurz vor Gebrauch 100 µl Acetaldehyd-Lösung zu 20 ml Diphenylamin-Lösung geben.

DNA-Standard (Eichlösung): 5,0 mg Kalbsthymus-DNA mit 0,5 M PCA 30 min bei 70 °C hydrolysieren, auf 100 ml auffüllen und bei 4 °C aufbewahren. 1 ml Lösung $\hat{=}$ 50 µg DNA-Hydrolysat.

2.4. Tiere

Die Untersuchungen wurden an weiblichen SPF-Wistar-Ratten (Institut für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg bei München) mit einem Gewicht von 218 ± 16 g durchgeführt.

Die Tiere wurden bis zum Erreichen des angegebenen Körperge-

wichtiges in Makrolonkäfigen bei 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 5 \%$ gehalten. Sie bekamen vor und nach den Operationen Wasser und Futter (altromin 1324) ad libitum.

2.5. Operationen

2.5.1. Teilhepatektomie

Die Tiere wurden in Äthernarkose auf einem geeigneten Operationstisch fixiert. Entsprechend der Methode von Higgins und Anderson (11) wurde nach Rasur und Desinfektion der Bauchwand ein medianer Hautschnitt im Bereich der Linea alba vom Nabel bis zum Processus xiphoideus sterni durchgeführt. Die darunterliegenden Muskelschichten wurden stumpf abgeschoben und dem Hautschnitt entsprechend durchtrennt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Freilegung des Leberhilus wurden der mediane und der linke laterale Leberlappen mit einem Catgut-Faden an ihren Wurzeln umschlungen und ligiert. Anschließend scharfe Abtragung beider Leberlappen und schichtweiser Wundverschluß der Bauchdecken mit fortlaufender Matratzennaht.

2.5.2. Venenpunktion (Venae sectio)

Die Infusion der verschiedenen Lösungen über einen Zeitraum von 15 - 25 h machte einen zuverlässigen und leicht erreichbaren venösen Zugang notwendig. Die Vv. femorales schienen hierfür am besten geeignet.

Die Venenpunktionen wurden direkt im Anschluß an die Teilhepatektomien in derselben Äthernarkose durchgeführt. Nach

Rasur und Desinfektion (Merfen[®] Orange) der Oberschenkelinnenseite und Leistenregion erfolgte ein Hautschnitt etwa von der Höhe des Leistenbandes bis zum Adduktorenkanal. Die V. femoralis wurde dargestellt und mit zwei Mersilene-Fäden unterfangen. Nach Punktion der Veine mit einer Kunststoffkanüle (Braunüle, Größe 0) wurde diese mittels der vorbereiteten Fäden eingebunden. Die Punktionsstelle wurde zusätzlich mit einem Tropfen Gewebekleber (Histoacryl[®] blau) abgedichtet. Nach Anschluß der Infusion wurde die Haut durch Einzelknopfnähte (Mersilene) und Nobecutan-Spray verschlossen.

2.6. Infusionen

2.6.1. Infusionstechnik

Direkt nach der Venenpunktion wurden die Tiere über eine mit Infusionslösung vorgefüllte Infusionsleitung an eine spezielle Infusionsspritze angeschlossen. Mittels des verwendeten Perfusionsapparates (Perfusor IV) und der darin eingespannten Spritze konnte die Infusionsgeschwindigkeit auf konstant 0,95 ml/h eingestellt werden. Noch während der Narkose wurde das Bein auf der Seite der punktierten V. femoralis zur Sicherung der Kanüle mit einem Holzspatel und Klebestreifen gesichert. Anschließend wurden die Tiere in Restriktionsmäntelchen gehängt. Gleitschienen, mit denen die Restriktionsmäntelchen verbunden werden konnten, erlaubten den Tieren Vorwärts- und Rückwärtsbewegungen auf einer Strecke von etwa 40 cm Länge.

2.6.2. Applikation der Infusionslösungen

In grober Annäherung an den gefundenen Verlauf der Konzentration des immunoreaktiven Glukagon im Blutplasma teilhepatektomierter Ratten (26) wurde die gesamte angegebene Glukagonmenge wie folgt aufgeteilt: 10 % wurden in den ersten 8 Stunden nach Infusionsbeginn gegeben, 70 % in den nächsten 8 Stunden und 20 % in den restlichen 8 Stunden. Bei einer Infusionsdauer von weniger als 24 Stunden wurde demgemäß die angegebene Gesamtmenge an Glukagon unterschritten und bei längerer Infusionsdauer überschritten.

2.7. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

2.7.1. Grundprinzip

Der Verbrauch bzw. der Einbau von Thymidin in die nukleäre DNA gilt als spezifisches Maß der DNA-Synthese. Die Einbaurate läßt sich - nach Zufuhr von radioaktiv markiertem Thymidin im Überschuß - durch Messung der Radioaktivität in den Zellkernen nach einer bestimmten Zeitspanne bestimmen. Zur Bewertung und Vergleichbarkeit der gemessenen Einbauraten werden diese zur Menge an nukleärer DNA in ein Verhältnis gesetzt. Die DNA-Syntheserate wird durch die spezifische Radioaktivität des radioaktiv markierten Thymidins ausgedrückt.

$$\text{Spezifische Radioaktivität} = \frac{\text{Zerfälle} / \text{Zeit}}{\text{DNA-Konzentration}} \quad \left[\frac{\text{Zpm}}{\mu\text{g}} \right]$$

2.7.2. Behandlung der Tiere

Genau eine Stunde vor Beendigung der Infusionen wurde den Tieren 50 μCi ($\pm$ 50 μl) ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidin (spezifische Aktivität 21,5 Ci/mmol) intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden in Äthernarkose durch Entbluten an der Bifurcatio aortae getötet. Der Tötungszeitpunkt lag immer zwischen 9 und 10 Uhr, um Beeinflussungen der Ergebnisse durch zirkadianperiodische Schwankungen zu vermeiden. Sofort nach der Tötung wurde die Leber entnommen, in Aluminiumfolie dicht verpackt und zur Unterbrechung weiterer Reaktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung in den darauffolgenden Tagen erfolgte die Aufbewahrung bei -20°C .

2.7.3. Gewinnung der Leberzellkerne

Modifizierte Methode nach Widnell und Tata (30).

1. Leber wiegen.
2. Gesamte Leber mit 9-fachem Volumen (w/v) an 0,32 M Saccharose-Lösung (3mM MgCl_2 ; pH 7,3) bei 1200 Upm in einem eisgekühlten Elvehjem-Potter mit Teflon-Kolben homogenisieren, insgesamt 12 Hübe.
3. Das Homogenat durch ein Nylonsieb (0,15 mm Maschenweite) filtern.
4. Davon 2 Aliquots zu je 2 ml in Reagenzgläsern bei $100 \times g$ in Minifuge (4°C) 15 Minuten zentrifugieren.
5. Überstand verwerfen.

6. Unterstand mit 2,4 M Sucrose-Lösung (w/v) in ein Plastikröhrchen (3,8 ml) des Rotors SB 405 einer IEC / B 60 Ultrazentrifuge (4°C) überführen.
7. Bei 110 000 x g ($r=\max.$) 30 Minuten zentrifugieren.
8. Überstand verwerfen. Der Unterstand enthält intakte Leberzellkerne.

2.7.4. DNA-Extraktion

Methode nach Burton (7).

1. Die nach 2.7.3. im Unterstand gewonnenen Zellkerne mit 5 ml eiskalter 0,25 M PCA in ein Reagenzglas aufnehmen, mischen und 30 Minuten bei 4°C stehen lassen.
2. 15 Minuten bei 4000 x g in Minifuge zentrifugieren.
3. Überstand verwerfen.
4. Unterstand mit 1 ml 0,5 N NaOH lösen und 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.
5. Menge genau halbieren.
6. Jede Hälfte mit 4,5 ml 0,5 M PCA versetzen und 30 Minuten bei 4°C stehen lassen.
7. 15 Minuten bei 4000 x g in Minifuge zentrifugieren.
8. Überstand verwerfen.
9. Unterstand mit 5 ml 0,5 M PCA bei 90°C für 20 Minuten hydrolysieren.
10. 15 Minuten bei 4000 x g in Minifuge zentrifugieren und den erhaltenen Überstand $\bar{U}_1$ aufheben.
11. Unterstand wie in 8. und 9. behandeln, den erhaltenen Überstand $\bar{U}_2$ mit $\bar{U}_1$ vereinigen und mischen.

2.7.5. Bestimmung des DNA-Gehaltes

Methode nach Burton (7).

Prinzip: Puringebundene Desoxyribose gibt mit Diphenylamin in einer Mischung von Essigsäure und Schwefelsäure eine blaue Verbindung unbekannter Natur.

1. Von dem in 2.7.4. erhaltenen DNA-haltigen Gemisch der Überstände $\bar{U}_1$ und $\bar{U}_2$ (2 ml) dreimal je 0,5 ml mit 1 ml einer Diphenylamin-Acetaldehyd-Lösung (2.3.) versetzen.
2. Für den Nullwert wird 0,5 M PCA verwendet und als DNA-Standard eine Lösung aus Kalbsthymus-DNA (2.3.).
3. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktionen bei 590 nm gegen Wasser photometrisch bestimmen.

2.7.6. Messung der Radioaktivität

1. 1,5 ml des in 2.7.4. erhaltenen Perchlorsäurehaltigen Gemisches $\bar{U}_1, \bar{U}_2$ mit 0,5 ml 1 N NaOH neutralisieren.
2. In Szintillationsfläschchen mit 5 ml Triton X-100 und 10 ml Toluol (0,6 % PPO) versetzen und kräftig mischen.
3. Für die Bestimmung des Nullwertes 1,5 ml 0,5 M PCA und für die Bestimmung des Standardwertes 1,5 ml 0,5 M PCA mit 10 μ l ^3H -Standard entsprechend wie $\bar{U}_1, \bar{U}_2$ behandeln.
4. Die Radioaktivität der Lösungen im Flüssigkeitsszintillationszähler messen.
5. Nach Abzug des Nullwertes den Ausbeutefaktor und die Radioaktivität der Proben berechnen.

2.7.7. Berechnung und statistische Auswertung

Die spezifische Radioaktivität wurde nach der in 2.7.1. angegebenen Formel berechnet. Sowohl die gemessene DNA-Menge als auch die Radioaktivität beziehen sich auf das gleiche DNA-haltige Probenvolumen $\bar{U}_1, \bar{U}_2$ (2.7.4.), so daß sich weitere Bezugsgrößen, wie z.B. die Lebermasse, erübrigen.

Die in den Tabellen 1 mit 3 angegebenen spezifischen Aktivitäten sind arithmetische Mittelwerte $\bar{x}$ mit den zuge-

hörigen Standardabweichungen s ; $s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n-1}}$.

Die nach den Ergebnissen in Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die jeweilige Anzahl der Tiere n .

$\mu\text{g DNA}$ ($n=9$) und nach einer entsprechenden Infusion mit 500 $\mu\text{g Glukagon}$ / 24 h / Tier lediglich $34,8 \pm 13,9 \text{ Zpm} / \mu\text{g DNA}$ ($n=7$).

4. BESPRECHUNG

Die Ergebnisse zeigen, daß Glukagon, welches über eine Dauer von 22 Stunden nach Teilhepatektomie in einem bestimmten Rhythmus infundiert wird, die DNA-Synthese in den Zellen der Restleber deutlich vermindert.

Der Mechanismus dieser Proliferationshemmung ist unbekannt. Es scheint theoretisch möglich, daß ein spezifisches Leberzellproliferationshormon mit Glukagon um denselben Rezeptor an der Leberzellmembran im Sinne einer kompetitiven Hemmung konkurriert. Dies setzt allerdings voraus, daß Glukagon und ein postuliertes Leberzellproliferationshormon, "Hepatopoetin" genannt, gemeinsame Strukturen im Gesamtmolekül besitzen.

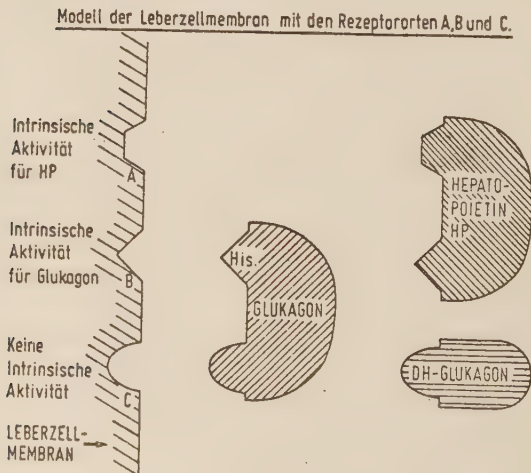
Es fällt auf, daß die Konzentration von Glukagonimmunoreaktiven Substanzen (GLI) im Blutplasma nach Teilhepatektomie stark ansteigt: der Ausgangswert wird zehn Stunden nach Teilhepatektomie um das 18-19 fache übertroffen (28).

Befände sich das postulierte Hepatopoetin in der Fraktion der Glukagonimmunoreaktiven Substanzen, hätte es also eine partielle Kreuzimmunoreaktivität mit Glukagon, so ließe sich der hemmende Einfluß von Glukagon nach Teilhepatektomie möglicherweise erklären. Hierzu in Einklang stünde auch die stärkere Hemmwirkung von Glukagon nach Zufuhr zunehmender Gesamtmengen (3.2.). Des weiteren ließe sich mit dieser Vorstellung die Beobachtung von Leffert et al. (16) erklären, daß die Affinität von Leberzellmembranen für Glukagon nach Teilhepatektomie abnimmt.

Diese Modellvorstellung einer Competition zwischen Glukagon

und dem postulierten Hepatopoetin wird allerdings fraglich durch eine gegenüber Glukagon gegensätzliche Wirkung von Des-Histidin-Glukagon (DH-Glukagon). Wird Des-Histidin-Glukagon teilhepatektomierten Ratten über 22 Stunden infundiert, so kommt es zu einer Steigerung der DNA-Synthese auf etwa das Doppelte gegenüber Kontrolltieren (3.4.). Diese Stimulation der Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie durch Des-Histidin-Glukagon könnte auf zwei Mechanismen beruhen:

1. Das zugeführte Des-Histidin-Glukagon unterdrückt die Ausschüttung von Glukagon. Der hemmende Einfluß von Glukagon auf die DNA-Synthese würde hiermit vermindert werden.
2. Glukagon und "Hepatopoetin" haben einen Rezeptorort B an der Leberzellmembran gemeinsam, Glukagon und Des-Histidin-Glukagon ebenfalls einen weiteren Ort C.



Wird Glukagon von Des-Histidin-Glukagon aus C verdrängt, entfällt auch seine Besetzung von B. "Hepatopoetin" könnte sich dann an die Membran anlagern. Dieses Modell der Leberzellmembran ist bisher rein spekulativ.

Die hemmende Wirkung von Glukagon auf die Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie nimmt mit sinkender Menge an zugeführtem Hormon ab (3.2.). Der untere Schwellenwert einer Wirksamkeit von Glukagon wurde jedoch nicht bestimmt, so daß keine Aussage über eine physiologische Bedeutung des Hormons in diesem Zusammenhang gemacht werden kann.

Auch wenn man die von uns gemessenen Konzentrationen an immunoreaktivem Glukagon im arteriellen Blutplasma nach Teilhepatektomie (26) zugrunde legt, und eine Halbwertszeit des Hormons im Organismus der Ratte von etwa 3,5 Minuten (3) annimmt, läßt sich die nach Teilhepatektomie erzeugte Menge an körpereigenem Glukagon / 24 h / Tier nur grob schätzen. Die infundierten Mengen an Glukagon liegen jedoch vermutlich deutlich höher und damit im pharmakologischen Bereich.

Dem möglichen Einwand, das infundierte Schweine-Rinder-Glukagon könnte eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit gegenüber Ratten-Glukagon haben, kann allerdings begegnet werden durch Befunde von Sundby und Markussen (29), die eine Identität von Glukagon der drei Tierarten wahrscheinlich machen.

Der Konzentrationsanstieg des immunreaktiven Glukagon im Blutplasma teilhepatektomierter Ratten ist also mög-

licherweise lediglich unspezifischer Natur und beruht sowohl auf der Stimulation durch vorhergehende metabolische Veränderungen im Serum dieser Tiere (27), als auch auf der verminderten Bindungskapazität der Leberzellmembranen für Glukagon (16).

Andererseits ist nicht auszuschließen, daß Glukagon die Leberregeneration nach Teilhepatektomie als Co-Faktor begünstigt. Es fällt auf, daß nach exogener Zufuhr von Glukagon histologische Veränderungen an Hepatozyten auftreten, die denjenigen nach Teilhepatektomie stark ähneln (19). Insbesondere die Zunahme der Anzahl an Mitochondrien und Lysosomen in beiden Fällen, sowie deren morphologische Veränderungen gelten als typisch für die prämitotische Phase (2). Demnach würde Glukagon die Leberzellteilung begünstigen und wäre somit möglicherweise Wegbereiter für ein spezifisch wirkendes "Hepatopoetin". Die vorliegenden Ergebnisse schließen jedenfalls aus, daß Glukagon als Einzelsubstanz die Leberzellproliferation nach Teilhepatektomie stimuliert.

Die Hoffnung, der Regelung der Hepatopoese nach Teilhepatektomie aber auf die Spur zu kommen, wächst jedoch in anbetracht der Charakterisierung und zunehmenden Anreicherung der Glykoproteidfraktion aus Blut und Leber teilhepatektomierter Ratten mit deutlich leberzellproliferativer Wirkung (9, 21).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Ratten führen Langzeitinfusionen von verschiedenen Mengen an Glukagon nur zu einer geringen Verminderung der DNA-Synthese der Leberzellen.

Bei einer zusätzlichen Teilhepatektomie bewirken Langzeitinfusionen von Glukagon eine starke Verminderung der DNA-Synthese in der Restleber, wohingegen sonst gleichartige Infusionen mit Des-Histidin-Glukagon die DNA-Synthese deutlich steigern.

6. ABKÜRZUNGEN

cAMP	zyklisches Adenosin 3',5' - Monophosphat (cyclic adenosine 3':5' - monophosphate)
Ci	Curie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
g	Erdbeschleunigung
GLI	Glukagonimmunoreaktive Substanzen (glucagon-like immunoreactivity)
h	Stunden
HP	"Hepatopoetin"
I.E.	Internationale Einheiten
IRG	Immunoreaktives Glukagon
IRI	Immunoreaktives Insulin
min	Minuten
PCA	Perchlorsäure (perchloric acid)
PPO	2,5 - Diphenyloxazol
SPF	spezifisch pathogenfrei
TH	Teilhepatektomie
Upm	Umdrehungen pro Minute
(w/v)	Masse / Volumen
Zpm	Zerfälle pro Minute

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Armato, U., Draghi, E., Andreis, P.: Endocrinology 102, 1155 (1978)
2. Barka, T.: The Liver and Its Diseases (Schaffner, F., Sherlock, S., Leevy, C. M., Hrsg.), 19; Thieme, Stuttgart 1974
3. Bloom, S. R.: Hepatotrophic Factors, Ciba Foundation Symposium 55, 161; Elsevier, Amsterdam 1978
4. Bucher, N. L. R., Malt, R. A.: Regeneration of Liver and Kidney; Little, Brown & Co., Boston 1971
5. Bucher, N. L. R., Swaffield, M. N.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1157 (1975)
6. Bucher, N. L. R., Patel, U., Cohen, S.: Hepatotrophic Factors, Ciba Foundation Symposium 55, 95; Elsevier, Amsterdam 1978
7. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
8. Duguay, L. R., Skivolocki, W. P., Lee, S., Orloff, M. J.: Gastroenterology 72, 1053 (1977)
9. Goldberg, M., Strecker, W., Feeny, D., Ruhenstroth-Bauer, G.: Horm. Metab. Res. 12, 94 (1980)
10. Grundmann, E., Seidel, H. J.: Handbuch der allgemeinen Pathologie VI/2 (Büchner, F., Hrsg.), 129; Springer, Berlin 1969
11. Hasegawa, K., Koga, M.: Life Sci. 21, 1723 (1978)

12. Higgins, G. M., Anderson, R. M.: Arch. Path. (Chicago) 12, 186 (1931)
13. Horrobin, D. F.: Prostaglandins 14, 667 (1977)
14. Junge, U., Creutzfeldt, W.: Hepatotrophic Factors, Ciba Foundation Symposium 55, 269; Elsevier, Amsterdam 1978
15. Leffert, H. L.: J. Cell Biol. 62, 792 (1974)
16. Leffert, H. L., Alexander, N. M., Faloona, G., Rubalcava, B., Unger, R.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4033 (1975)
17. Leffert, H. L., Koch, K. S.: Hepatotrophic Factors, Ciba Foundation Symposium 55, 61; Elsevier, Amsterdam 1978
18. MacManus, J. P., Whitfield, J. F.: Prostaglandins 6, 475 (1974)
19. Murray, A. B., Strecker, W., Silz, S., Ruhenstroth-Bauer, G. (zur Veröffentlichung eingereicht)
20. Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Sundby, F.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 909 (1971)
21. Ruhenstroth-Bauer, G., Goldberg, M., Silz, S., Strecker, W.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 543 (1978)
22. Schindler, R.: Handbuch der allgemeinen Pathologie VI/2. (Büchner, F., Hrsg.), 1; Springer, Berlin 1969
23. Sgro, J. C., Charters, A. C., Grambort, D. E., Broelsch, C., Orloff, M. J.: Digestion 10, 244 (1974)
24. Starzl, T. E., Porter, K. A., Putnam, W. P.: Lancet ii, 1241 (1975)

25. Starzl, T. E., Terblanche, J., Porter, K. A., Jones, A. F., Usui, S., Mazzoni, G.: Lancet i, 127 (1979)
26. Strecker, W., Silz, S., Ruhenstroth-Bauer, G. und Böttger, I.: Z. Naturforsch. 35 c, 65 (1980)
27. Strecker, W., Silz, S., Salem, A., Ruhenstroth-Bauer, G.: Horm. Metab. Res. (im Druck)
28. Strecker, W., Ruhenstroth-Bauer, G. und Böttger, I. (zur Veröffentlichung eingereicht)
29. Sundby, F., Markussen, J.: Horm. Metab. Res. 3, 184 (1971)
30. Widnell, C. C., Tata, J. R.: Biochem. J., 92, 313 (1964)

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer, nicht nur für seine großzügige Hilfestellung bei der Durchführung dieser Arbeit, sondern mehr noch für seine stets aufgeschlossene und tolerante Haltung im zwischenmenschlichen Bereich.

Weiterhin danke ich

Herrn Dr. S. Silz für seine Geduld und seine Bemühungen bei der Einarbeitung in die Problematik des Themas,

Herrn Prof. Dr. E. Wunsch für das geschenkte Des-Histidin-Glukagon und

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner für die freundliche Übernahme des zweiten Referates.

Lebenslauf

17. 4.1950 Geburt in München als viertes Kind des Dipl.
Ing. Julius Strecker und seiner Ehefrau Ilse,
geb. Gaebler
- . 8.1956 Volksschule in Schöngesing
- . 8.1960 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium
in Fürstenfeldbruck
28. 6.1969 Reifezeugnis
- 13.11.1969 Zivildienst
15. 4.1971 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
18. 4.1975 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Bio-
chemie in Martinsried bei München
- 9.12.1976 Staatsexamen
1. 1.1978 Medizinalassistentenzeit am Kreiskrankenhaus
Fürstenfeldbruck, innere und chirurgische Ab-
teilung
1. 1.1979 Approbation als Arzt
Chirurgische Abteilung, Kreiskrankenhaus Fürsten-
feldbruck
1. 7.1979 Geburt einer Tochter, Lisa Verena
- 1.11.1979 Anästhesiologische Abteilung, Kreiskrankenhaus
Dingolfing
1. 9.1980 Pathologisches Institut der Universität München

